

4. Kang D.G., Kim J.W., Lee J. Effects of nitric oxide synthesis inhibition on the Na,K-ATPase activity in the kidney //Pharmacol. Res. - 2000. - V.41. - P.121-125.

МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ОКСИДА АЗОТА НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СОСУДИСТЫХ ГЛАДКИХ МЫШЦ

Андрухов О.Я., Сагач В.Ф.

Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, г. Киев

Введение

Вещества эндотелиального происхождения играют важную роль в регуляции сосудистого тонуса [1]. Одним из таких веществ является оксид азота (NO). NO является одной из наименьших биологически активных веществ, которое может легко диффундировать через мембранный барьер, что делает его удобным посредником в регуляции местных сосудистых реакций. Оксид азота вызывает расслабление сосудистых гладких мышц (ГМ). Основным механизмом такого действия NO считается активация растворимой гуанилатциклазы, что приводит к возрастанию внутриклеточного уровня цГМФ и активации специфического фермента цГМФ-зависимой протеинкиназы [3]. Это в конечном итоге приводит к расслаблению ГМ вследствие уменьшения $[Ca^{2+}]_i$ и увеличения активности фосфатазы легких цепей миозина. Однако цГМФ-зависимый механизм не является единственным. NO может также непосредственно активировать Ca^{2+} -зависимые калиевые каналы [2]. Данный цГМФ-независимый механизм также не является единственным, так как доноры NO вызывают расслабление препаратов ГМ животных с отсутствующим геном цГМФ-зависимой протеинкиназы и при условии блокады Ca^{2+} -зависимых калиевых каналов [4], что говорит о существовании еще не изученных механизмов действия оксида азота в ГМ. Цель настоящей работы состояла в исследовании механизмов дилататорного действия оксида азота, не связанных с активацией цГМФ-зависимого сигнального пути.

Материалы и методы исследования

Исследования проводились на изолированных интактных и скиннированных препаратах воротной вены и аорты крыс линии Вистар массой 200-250г. Сосудистые препараты помещали в термостатированную камеру, растягивали с силой 4-6 мН в случае воротной вены и 15-20 мН в случае аорты, перфузировали стандартным раствором Кребса

(ммоль/л): NaCl-133, KCl-4,7, NaHCO₃-16,3, NaH₂PO₄-1,38, MgCl₂-1,05, глюкоза-12, CaCl₂-2,5, pH-7,4, и оставляли для стабилизации на 30-60 мин. Гиперкалиевый раствор (100 мМ KCl) готовили путем эквимольной замены Na⁺ на K⁺ в растворе Кребса. Для скинирования препаратов камеру перфузировали так называемым релаксирующим раствором такого состава (ммоль/л): KCl-130, MgCl₂-5 АТФ-3,3, ЕГТА-4, трис-20, pH-6,8 и оставляли для стабилизации на 20 мин. Скинирование проводили путем добавления к перфузату сапонина в концентрации 0,8-1,0 мг/мл и инкубации в течение 20 мин. Сокращение вызывали путем добавления к релаксирующему раствору CaCl₂. Регистрацию сокращений проводили в режиме, приближенном к изометрическому, с помощью механоэлектрического преобразователя 6MX1C. Исследования проводили при комнатной температуре 24-26 °С для скинированных препаратов и 35-37 °С для интактных.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе работы нами изучались механизмы дилататорного влияния оксида азота в ГМ. Экзогенный донор NO нитропруссид натрия (НН) вызывал изменения параметров сократительной активности деэндотелизованных препаратов воротной вены, причем изменялись как частота, так амплитуда фазных сокращений. Уменьшение амплитуды составляло $17,3 \pm 3,8$ % ($n=5$) при 10^{-5} М НН и $31,6 \pm 5,2$ % ($n=5$) при 10^{-4} М НН. Частота сокращений уменьшалась на $19,4 \pm 3,2$ % ($n=5$) при 10^{-5} М НН и $30,9 \pm 6,1$ % ($n=5$) при 10^{-4} М НН. При условии блокады активности растворимой гуанилатциклазы метиленовым синим (50 мкМ) НН также вызывал изменения параметров сократительной активности. Уменьшение амплитуды составляло $23,4 \pm 4,9$ % ($n=5$) при 10^{-5} М НН и $42,9 \pm 5,7$ % ($n=5$) при 10^{-4} М НН. Частота сокращений практически не изменялась.

В следующей серии нами исследовались механизмы действия оксида азота, выделяемого эндотелием на сократительную активность изолированных препаратов аорты. Сокращение вызывали гиперкалиевым раствором (100 мМ KCl), а после достижения фазы плато к перфузату добавляли ацетилхолин (10^{-6} М), что приводило к расслаблению. Величина этого эндотелий-зависимого расслабления составляла $51,4 \pm 5,9$ % ($n=6$) от начальной амплитуды сокращения. В присутствии блокатора растворимой гуанилатциклазы метиленового синего (50 мкМ) величина расслабления на ацетилхолин составляла $24,2 \pm 6,3$ % ($n=6$) от начальной амплитуды сокращения. Аналогично было проведено исследование по влиянию эндогенного оксида азота на сокращение, вызванное норадреналином (10^{-5} М). Ацетилхолин (10^{-6} М) вызывал расслабление, величина которого составляла $67,5 \pm 6,3$ % ($n=6$) от начальной амплитуды сокращения. Аналогичные исследования были проведены и при

условии блокады растворимой гуанилатциклазы метиленовым синим. В этом случае амплитуда сокращения под влиянием эндотелиального оксида азота уменьшалась на $39,1 \pm 5,4\%$ ($n=6$) от начального значения.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что дилататорный эффект оксида азота как эндогенного, так и экзогенного происхождения реализуется как вследствие активации растворимой фракции гуанилатциклазы, так и через механизмы, не связанные с ее активацией.

На следующем этапе нами было исследовано влияние НН на сократительную активность скинированных препаратов воротной вены крыс. Сокращение вызывали путем повышения концентрации Ca^{2+} до 10^{-4} М. Амплитуда сокращения составляла $1,3 - 1,7$ мН/мг. Для исследования влияния оксида азота к перфузату после достижения фазы плато сокращения добавляли НН в концентрации от 10^{-6} до 10^{-4} М, что приводило к дозозависимому уменьшению амплитуды сокращения. При концентрации НН 10^{-6} М уменьшение амплитуды составляло $13,5 \pm 6,2\%$ ($n=6$, $P<0.05$), в концентрации 10^{-5} М – $31,6 \pm 7,1\%$ ($n=8$, $P<0.01$), в концентрации 10^{-4} М – $54,2 \pm 7,9\%$ ($n=8$, $P<0.001$) в сравнении с величиной начального сокращения. Величина эффекта НН не изменялась в присутствии метиленового синего (50 мкМ). Это позволяет сделать вывод, что данный эффект оксида азота не связан с активацией растворимой гуанилатциклазы и не опосредован классическим цГМФ-зависимым механизмом.

Нами также было исследовано влияние НН на сократительную активность скинированных препаратов аорты крыс. В таких препаратах сокращение также вызывали путем повышения концентрации Ca^{2+} в перфузате до 10^{-4} М, что сопровождалось тоническим сокращением. Амплитуда сокращения в аортальных препаратах становила $1,3-1,5$ мН/мг. Как и в случае воротной вены, добавление к перфузату НН в концентрациях от 10^{-6} М до 10^{-4} М вызывало дозозависимое расслабление, величина которого составляла $16,3 \pm 4,2\%$ ($n=5$) при 10^{-6} М, $37,7 \pm 5,1\%$ ($n=6$) – при 10^{-5} М, в концентрации $51,5 \pm 5,9\%$ ($n=8$) – 10^{-4} М. Как и в случае воротной вены, данный эффект не блокировался метиленовым синим.

В скинированных препаратах концентрация Ca^{2+} фиксируется на постоянном уровне, а сократительная активность таких препаратов определяется свойствами сократительного аппарата. Расслабление, вызванное донором оксида азота НН в скинированных препаратах обусловлено взаимодействием NO с сократительными белками ГМ. Такое взаимодействие приводит к снижению чувствительности сократительного аппарата к Ca^{2+} , и это может быть одним из механизмов действия NO в ГМ.

Литература

1. Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., Шаповал Л.М. та співавт. Роль ендотелію та біологічно активних речовин ендотеліального походження в регуляції кровообігу і діяльності серця // Фізіол.Ж.-1997. – Т. 43, №1-2.-С.3-18.
2. Bolotina V.M., Najibi S., Palacino J.J. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle // Nature.-1994. – Vol.368, №6474. - P.850-853.
3. Lucas K.A., Pitari G.M., Kazerounian S. et al. Guanylyl cyclases and signalling by cyclic GMP // Pharmacol.Rev.-2000.-Vol.52, №3-P.375-413.
4. Pfeifer A., Klatt P., Massberg S. et al. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice // EMBO J. – 1998. – Vol.17, №7. – P.3045-3051.

ОСОБЕННОСТИ ЭФФЕКТОВ АДФ НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ СЕРДЦА И КОРОНАРНЫЙ ПОТОК ПРИ БЛОКАДЕ СИНТЕЗА NO

Антоненко А.Н., Суворова Т.А.

Институт радиобиологии НАН Беларуси, г. Минск

Введение

Важная роль в регуляции кровообращения принадлежит эндотелию сосудов. NO является основным вазодилататором эндотелиального происхождения, а также медиатором взаимодействия эндотелиоцитов с тромбоцитами и, следовательно, играет одну из главных ролей в обеспечении антиагрегационных свойств крови. Известно, что агрегирующие тромбоциты высвобождают вазоактивные вещества: АДФ, серотонин, тромбин и другие. Установлена способность АДФ взаимодействовать с эндотелием сосудов и вызывать NO-опосредованную вазодилатацию. Если констрикторные и агрегационные механизмы преобладают над дилаторными и антиагрегационными, то наступают тромбообразование и коронарospазм. Для нормального функционирования сердца необходим непрерывный и достаточный коронарный кровоток. Исходя из вышеизложенного, представляется актуальным установить роль NO-опосредованных механизмов в реализации кардиотропных и вазоактивных свойств продуктов агрегации тромбоцитов, в частности, АДФ.

Материалы и методы исследований

Эксперименты выполнены на белых крысах-самках зрелого возраста (6 мес.). Под тиопенталовым наркозом (60 мг/кг внутривенно)